

については、経口投与では吸収がよいと報告されているが (IARC 1999)、吸入暴露での報告は入手できなかった。そこで、経口投与の吸収率と吸入暴露の吸収率が等しいと仮定してとして計算した。その結果、経口投与の12.5 mg/kg群、25 mg/kg群、50 mg/kg群および100 mg/kg群は、それぞれ、吸入暴露濃度12.7 ppm、25 ppm、51 ppmおよび101 ppmに変換された。

この値を、今回の実験で得られた体内暴露量を指標として検証した。体内暴露量は、「生体影響が体内暴露の総量に依存する場合」と「生体影響の発現する血液濃度に閾値が存在する場合」を想定し、「AUC」と「血液中濃度の最高値」の両者を指標とした (Table 5)。

「AUC」を指標とした検証は、各経口投与用量に相当するAUCが得られる暴露濃度を吸入暴露濃度とAUCの関係の表 (Table 4) から読み取り、換算式により得られた値と比較した。その結果、経口投与用量の25 mg/kg群、50 mg/kg群、100 mg/kg群に相当するAUCが得られる吸入暴露濃度は45 ppm、120 ppm、195 ppmであった。換算式から得られた値 (25 ppm、51 ppm、101 ppm) は、AUCから推測される暴露濃度と比較して0.43から0.56倍であり、各用量とも低い値であると判断された。なお、12.5 mg/kg群に相当するAUCが得られる暴露濃度は、表の下限以下であるため25 ppm以下として表したが、換算式から得られた値 (12.7 ppm) の約50%であり、他の投与量と同様に低い値であると推察された。

「血液中濃度の最高値」を指標とした検証は、各経口投与用量に相当する血液中濃度の最高値が得られる暴露濃度を吸入暴露濃度と血液中濃度の最高値の関係の表 (Table 4) から読み取り、換算式により得られた値と比較した。その結果、経口投与用量の12.5

mg/kg群、25 mg/kg群、50 mg/kg群、100 mg/kg群に相当する「血液中濃度の最高値」が得られた吸入暴露濃度は93 ppm、143 ppm、199 ppm、376 ppmであった。換算式から得られた値 (12.7 ppm、25 ppm、51 ppm、101 ppm) は、「血液中濃度の最高値」から推測される暴露濃度と比較して、0.14から0.27倍であり、各用量とも低い値であると判断された。

以上のように、換算式を用いて経口投与の実験データから吸入暴露による生体影響を推定する方法をクロロホルムをモデルとして検証した結果、①換算式を用いて計算した暴露濃度は、体内暴露量に基づいて推測された暴露濃度に比べ低い値になる、②従って、毒性を過大に評価する可能性がある、③しかし、その値はAUCを指標にした場合には約0.5倍であることがわかった。

(5) トルエンをモデルとした換算式の有効性の検証との比較

平成16年度は、トルエンをモデルとして、吸入暴露と経口投与による体内暴露量の比較により換算式の有効性を検証した。その結果、トルエンでは、①換算式を用いて計算した暴露濃度は、体内暴露量に基づいて推測された暴露濃度に近似した値になる、②ただし、高用量ではやや高い値になり、毒性を過少に推定するが、その差は1.8倍以内であることがわかった。

本年度に行ったクロロホルムをモデルとした検証の結果では、換算式を用いて計算した暴露濃度は、体内暴露量に基づいて推測された暴露濃度に比べ低い値 (約0.5倍) であった。

トルエンおよびクロロホルムをモデルとして得られた検証結果は、化学物質の種類によって換算式の有効性が異なることを示している。また、吸入暴露による毒性を経口投与実験のデータから換算式によって推定す

る場合、換算式から得られた値と実際の値の間には2倍から0.5倍の差が生じる可能性があることを念頭におく必要があることを示している。

2. 腹腔内投与による体内暴露量との比較によるトルエンおよびクロロホルムの体内への吸収率の推定

吸入暴露による生体影響を経口投与実験のデータから推定するための換算式は、「経口投与用量×経口投与の吸収率＝吸入暴露濃度×呼吸量×吸入暴露の吸収率」であり、経口投与での消化管からの吸収率および吸入暴露での呼吸器からの吸収率は換算式の結果を左右する因子となる。しかし、化学物質の体内への吸収率、特に吸入暴露での呼吸器からの吸収率のデータは、入手できないことが多いため、経口投与と吸入暴露の吸収率が等しいと仮定して計算することが多い。今回の検証でも、トルエン、クロロホルムとも経口投与と吸入暴露の吸収率が等しいと仮定して計算した。そこで、吸収率の因子が換算式にどの程度関与しているのかを調べるために、吸入暴露と経口投与の大きな吸収率を推定することを試みた。

腹腔内投与した化学物質は全て体内に入るため、体内に100%吸収されると仮定できる。従って、トルエンとクロロホルムを腹腔内投与した時の体内暴露量を測定し、経口投与や吸入暴露した時の体内暴露量と比較することによって、それぞれの投与経路における体内への吸収率を推定できると考えた。

その結果、トルエンの経口投与による吸収率は、25 mg/kg体重の投与では28%、50 mg/kg体重では19%、100 mg/kg体重では27%、200 mg/kg体重では38%であり、各投与用量ともほぼ一定であった。吸入暴露による吸収率は、暴露濃度が25 ppm群では20%、50 ppmでは29%、100 ppmでは62%、200 ppm群では59%であり、50 ppm以下の暴露濃度における吸収

率が経口投与に近似していたのに対し、100 ppm以上の暴露濃度では経口投与の約2倍の吸収率になるという結果が得られた。トルエンをモデルとした換算式の有効性の検証でも、換算式により得られた値は低用量では体内暴露量（AUC）から推定した値と近似した値が得られたが、高用量では換算式から得られる濃度がやや高くなる（1.8倍以内）という結果が得られており、換算式から得られる値と体内暴露量からの推測値の差は投与経路間の吸収率の差が原因である可能性が示唆された。

クロロホルムについては、経口投与による吸収率は12.5 mg/kg体重の投与では47%、25 mg/kg体重の投与では52%、50 mg/kg体重では54%、100 mg/kg体重では30%であった。吸入暴露による吸収率は、暴露濃度が50 ppmでは32%、100 ppmでは10%であり、経口投与の吸収率に比較して低いという結果が得られた。クロロホルムをモデルとした換算式の有効性の検証でも、換算式により得られた値は、体内暴露量に基づいて推測された暴露濃度（AUC）に比べ約0.5倍低い値になっており、トルエンと同様に、換算式から得られる値と体内暴露量からの推測値の差は投与経路間の吸収率の差が原因である可能性が示唆された。

これらの結果は、経口投与のデータから換算式を用いて吸入暴露による毒性を推定する際に、経口投与と吸入暴露の両者の吸収率を考慮することの重要性を示している。

なお、トルエンの吸収率に関する過去の資料では、イヌの実験から吸入による肺への取り込み率が91-94%、経口投与では100%と報告されている（IARC 1989）。今回の実験で得られた吸収率は、これまでの報告に比べて吸入暴露および経口投与とも低い値であり、また、暴露濃度により吸収率が変動することが示された。また、クロロホルムの吸収率も経口投与では吸収がよいと報告されているが（IARC 1999）、今回の実験で得られた吸収率は30%から54%

であった。今回得られた吸収率の値はこれまでの知見と差があり、吸収率に関するさらなる研究が必要であると考えられる。

3. 化学物質の呼気中への排泄量を測定する方法の開発

化学物質の呼気中への排泄量の測定は、放射性同位元素を使用した研究が多い。しかし、揮発性の高い化学物質の放射性同位元素を使用した実験は安全性の問題があり、研究の実施が困難である。本研究で使用した方法は、吸入実験装置に簡単な改良を加えるだけであり、通常の施設でも実施が可能である。トルエンをラットに腹腔内投与して、この方法の有効性を調べた結果、腹腔内投与したトルエンの量に対し25 mg /kg体重では34%、50 mg /kg体重では46%、100 mg /kg体重では42%、200 mg /kg体重では73%が投与後540分までに捕集された。実験動物を用いた研究では、体内に吸収されたトルエンのうち約20%から40%が呼気中に未変化体として速やかに排泄されると報告されている (IPCS, 1986)。今回の方法でも、25 mg /kg体重から100 mg /kg体重の投与における捕集率は、IPCSの報告に相当する値であり、今回開発した方法は呼気中への化学物質の排泄量の測定に有効であると考えられた。

E. 結論

本年度の研究の結果、以下の結論を得た。

- 1) クロロホルムをモデルとして、経口投与実験データから吸入暴露による生体影響を推定する換算式の有効性について体内暴露量を指標にして検証した。その結果、換算式を用いて計算した暴露濃度は体内暴露量に基づいて推測された暴露濃度に比べ約0.5倍低い値になり、毒性を過大に評価する可能性があることがわかった。
- 2) トルエンをモデルとした検証 (平成16年度) では、換算式を用いて計算した暴

露濃度は体内暴露量に基づいて推測された暴露濃度に近似した値になる。ただし、高濃度ではやや高い値 (1.8倍以内) になり毒性を過少に推定するという結果が得られている。クロロホルムとトルエンをモデルとした検証結果は、化学物質の種類によって換算式の有効性が異なることを示している。また、吸入暴露による毒性を経口投与実験のデータから換算式によって推定する場合、換算式から得られた値と実際の値の間には2倍から0.5倍の差が生じる可能性があることを念頭におくことの必要性が示された。

- 3) クロロホルムの吸入暴露による吸収率 (10%~32%) は、経口投与による吸収率 (30%~54%) に比較して低かった。トルエンの吸入暴露による吸収率は、低濃度では経口投与の吸収率に近似していたのに対し、高濃度では経口投与の約2倍であった。従って、換算式から得られる値と体内暴露量からの推測値の差は吸収率の差が原因になっている可能性が示唆された。この結果は、換算式を用いて計算に際して吸入暴露の両者の吸収率を考慮することの重要性を示している。
- 4) 呼気への化学物質の排泄量を測定するために、吸入実験装置に簡単な改良を加えた装置を作製した。トルエンをラットに腹腔内投与して有効性を調べた結果、腹腔内投与した量の34%から73%が投与後540分までに捕集され、呼気中への排泄量の測定に利用できると考えた。

F. 参考文献

- 1) International Agency for Research on Cancer (IARC). 1989. Toluene. IARC Monographs on the Evaluation of

- Carcinogenic Risks to Humans
47:79-123.
- 2)International Agency for Research on
Cancer (IARC). 1999. Chloroform. IARC
Monographs on the Evaluation of
Carcinogenic Risks to Humans
73:131-182.
- 3)International Programme on Chemical
Safety (IPCS). 1986. Toluene.
Environmental Health Criteria 52.
- 4)Mauderly JL, Tesarek JE, Sifford LJ,
Sifford LJ. 1979. Respiratory
measurements of unsedated small
laboratory mammals using
nonrebreathing valves. Lab Anim Sci
29: 323-329.
- G. 健康危機情報
なし
- H. 研究発表
1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし
- I. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Table 1. 吸入チャンバー内のクロロホルム濃度

吸入暴露群	50ppm 群	100ppm 群	200ppm 群	400ppm 群
	49.9±0.77 ^a	99.2±2.78	201±3.98	400±4.10

a:クロロホルム濃度(ppm)：平均値±標準偏差

Table 2. クロロホルムを吸入暴露したラットの血液中エチルベンゼン濃度および AUC

吸入暴露群	50ppm 群	100ppm 群	200ppm 群	400ppm 群	
暴露中	15 分	1.41±0.07 ^a	1.79±0.15	2.13±0.14	4.11±0.46
	30 分	1.61±0.01	1.81±0.01	2.95±0.19	5.04±0.20
	60 分	1.62±0.07	2.08±0.11	4.48±0.11	10.00±2.09
	180 分	1.63±0.09	2.15±0.25	6.92±0.22	11.40±1.52
	360 分	1.66±0.02	1.98±0.06	6.64±0.63	17.95±3.25
暴露後	30 分	1.27±0.06	0.58±0.07	4.82±0.71	10.86±1.45
	60 分	1.04±0.05	0.31±0.01	2.64±1.16	4.59±2.59
	180 分	0.22±0.01	0.82±0.01	1.21±0.20	0.64±0.28
AUC ^b	705	844	2585	5228	

a:クロロホルムの血液中濃度(μg/mL)：平均値±標準偏差

b:暴露中 360 分間および暴露終了後 180 分間における Area Under the Curve (μg 分/mL)

Table 3. クロロホルムを経口投与したラットの血液中クロロホルム濃度および AUC

経口投与群	12.5mg/kg 群	25mg/kg 群	50mg/kg 群	100mg/kg 群
15 分	1.33±0.70 ^a	3.85±1.87	4.85±2.32	16.63±0.93
30 分	2.08±0.30	3.69±2.15	6.79±1.23	14.92±1.97
60 分	1.60±0.38	4.18±2.83	6.86±1.98	13.74±2.07
180 分	0.28±0.03	1.20±1.08	1.98±1.71	4.92±0.59
360 分	0.19±0.00	0.24±0.04	0.38±0.14	0.49±0.11
390 分	0.19±0.01	0.23±0.04	0.28±0.08	1.04±0.30
420 分	0.22±0.04	0.24±0.03	1.62±1.83	0.56±0.02
540 分	0.22±0.05	0.23±0.04	0.23±0.01	0.37±0.08
AUC ^b	284	698	1221	2501

a:クロロホルムの血液中濃度(μg/mL)：平均値±標準偏差

b:経口投与後 540 分間における Area Under the Curve (μg・分/mL)

Table 4. クロロホルムを吸入暴露または経口投与したラットの血液中クロロホルム濃度

		最高値 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	最高値に達す る時間 (分) *1	半減期 (分) *2	AUC ($\mu\text{g}\cdot$ 分 / mL) *3
吸入 暴露	50 ppm	1.66	30	90	705
	100 ppm	2.15	60	21	844
	200 ppm	6.92	180	51	2585
	400 ppm	17.95	≥ 360	39	5228
経口 投与	12.5 mg/kg 体重	2.08	30	80	284
	25mg/kg 体重	4.18	60	84	698
	50 mg/kg 体重	6.86	60	84	1221
	100 mg/kg 体重	16.63	15	119	2501

*1：吸入暴露は最高濃度の90%以上の濃度に達する時間

*2：経口投与（最大値から1/2になる時間）、吸入暴露（暴露終了時から1/2になる時間）

*3：540分間（投与開始から血液中濃度測定終了までの時間）におけるAUC

Table 5. クロロホルムの経口投与の吸入暴露への換算式による変換および検証

経口投与用量	吸入暴露濃度 への変換 (A)	AUCによる検証		血液中濃度の最高値による検証	
		相当吸入暴露 濃度 (B)	A/B	相当吸入暴露 濃度 (C)	A/C
12.5mg/kg 群	12.7ppm	25ppm \gt	-	93ppm	0.14
25mg/kg 群	25ppm	45ppm	0.56	143ppm	0.17
50mg/kg 群	51ppm	120ppm	0.43	199ppm	0.26
100mg/kg 群	101ppm	195ppm	0.52	376ppm	0.27

(A) 換算式により得た暴露濃度

(B) 経口投与用量に相当するAUC値となる吸入暴露濃度

(C) 経口投与用量に相当する血液中濃度の最大値となる吸入暴露濃度

A/B：換算式により得た吸入暴露濃度 / 経口投与用量に相当するAUC値となる吸入暴露濃度

A/C：換算式により得た吸入暴露濃度 / 経口投与用量に相当する血液中濃度の最大値となる吸入暴露濃度

Table 6. トルエンを腹腔内に投与したラットの血液中トルエン濃度および AUC

腹腔投与群	25mg/kg 群	50mg/kg 群	100mg/kg 群	200mg/kg 群
30 分	1.92±0.72 ^a	6.14±1.99	6.55±0.58	13.55±2.28
60 分	2.78±0.59	7.13±0.95	11.51±1.32	21.06±0.69
180 分	4.11±0.64	8.48±1.21	18.20±0.83	30.90±3.32
360 分	0.72±0.10	1.94±0.42	7.36±1.07	15.29±1.85
390 分	0.59±0.08	1.60±0.31	5.95±1.06	12.63±3.15
420 分	0.42±0.05	1.05±0.09	4.55±0.68	8.14±3.36
540 分	0.27±0.00	0.63±0.07	1.99±0.17	4.57±1.45
AUC ^b	1022	2360	5202	9491

a トルエンの血液中濃度(μg /mL) : 平均値±標準偏差

b 腹腔投与後 540 分間における Area Under the Curve (μg・分/mL)

Table 7. トルエンの吸入暴露での吸収率の推定

吸入暴露			吸入暴露の推定吸入量を腹腔投与したと仮定した場合の AUC の期待値 (C)	吸入暴露の吸収率 (A)/(C)
暴露濃度	AUC (A)	推定吸入量 (B)		
25 ppm	159	19 mg /kg	777	20%
50 ppm	505	39 mg /kg	1771	29%
100 ppm	2419	77 mg /kg	3893	62%
200 ppm	4474	155 mg /kg	7561	59%

(A) : 暴露中 360 分間、暴露終了後 180 分間、計 540 分間の AUC (μg・分 / mL)

(B) : トルエンの換算係数を 3.83 mg/m³ : 1 ppm、ラットの呼吸量を 561 mL / kg 体重・分 (Maunderly et al. 1979) として計算

(C) : 投与後 540 分間の AUC (μg・分 / mL)

Table 8. トルエンの経口投与での吸収率の推定

投与用量	AUC		経口投与の吸収率 (A)/(B)
	経口投与(A)	腹腔内投与(B)	
25 mg /kg 体重	288	1022	28%
50 mg /kg 体重	457	2360	19%
100 mg /kg 体重	1399	5202	27%
200 mg /kg 体重	3561	9491	38%

(A) ,(B) : 投与後 540 分間の AUC (μg・分 / mL)

Table 9. クロロホルムを腹腔内に投与したラットの血液中クロロホルム濃度および AUC

腹腔投与群	12.5mg/kg 群	25mg/kg 群	50mg/kg 群	100mg/kg 群
15 分	1.50±0.28 ^a	6.70±2.21	7.73±0.68	10.79±4.65
30 分	2.54±0.13	5.70±0.86	11.77±3.11	20.11±3.64
60 分	3.65±0.59	7.25±1.53	8.58±3.05	31.31±3.04
180 分	0.97±0.89	3.29±0.88	7.25±3.59	27.03±4.95
360 分	0.62±0.54	0.40±0.09	0.76±0.02	7.67±2.39
390 分	0.20±0.01	0.27±0.03	0.39±0.11	8.78±1.67
420 分	0.30±0.22	0.26±0.05	0.44±0.23	3.00±1.57
540 分	0.18±0.00	0.19±0.01	0.24±0.01	1.52±1.43
AUC ^b	603	1346	2250	8402

a クロロホルムの血液中濃度 (µg / mL) : 平均値±標準偏差

b 腹腔投与後 540 分間における Area Under the Curve (µg ·分 / mL)

Table 10. クロロホルムの吸入暴露による吸収率の推定

吸入暴露			吸入の推定吸入量を腹腔内投与したと仮定した場合の AUC の期待値 (C)	吸入暴露の吸収率 (A)/(C)
暴露濃度	AUC (A)	推定吸入量 (B)		
50 ppm	705	49 mg /kg 体重	2225	32%
100 ppm	844	99 mg /kg 体重	8353	10%
200 ppm	2585	197 mg /kg 体重	*	*
400 ppm	5228	394 mg /kg 体重	*	*

(A) : 暴露中 360 分間、暴露終了後 180 分間、計 540 分間の AUC (µg ·分 / mL)

(B) : クロロホルムの換算係数を 4.88 mg/m³ : 1 ppm、ラットの呼吸量を 561 mL/ kg 体重 ·分 (Maunderly et al. 1979) として計算

(C) : 投与後 540 分間の AUC (µg ·分 / mL)

* : 腹腔内投与の最高投与用量を超えているため計算を行なわなかった

Table 11. クロロホルムの経口投与による吸収率の推定

投与用量	AUC		経口投与の吸収率 (A)/(B)
	経口投与(A)	腹腔内投与(B)	
12.5 mg /kg 体重	284	603	47%
25 mg /kg 体重	698	1346	52%
50 mg /kg 体重	1221	2250	54%
100 mg /kg 体重	2501	8402	30%

(A) ,(B) : 投与後 540 分間の AUC (µg ·分 / mL)

Table 12 腹腔内投与したトルエンの呼気への排泄量

投与用量	捕集量 (mg /kg 体重・分) *1					総捕集量 mg /kg 体重 *2	捕集率 (%) *3
	0-30分	30-60分	60-180 分	180-360 分	360-540 分		
25 mg /kg 体重	0.048	0.046	0.037	0.004	0.002	8.4	34
50 mg /kg 体重	0.031	0.109	0.097	0.040	0.005	23.1	46
100 mg /kg 体重	0.103	0.111	0.140	0.054	0.072	42.2	42
200 mg /kg 体重	0.740	0.394	0.377	0.300	0.149	146.6	73

*1 : 1 分間当りの捕集量

*2 : 540 分間の捕集量の合計

*3 : 総捕集量 / 投与用量 × 100

付表 1 呼気のトルエン分析における GC/MS の分析条件

Operating conditions for GC/MS analysis

GC	HP 5890 Series II
Column	EQITY-5, 60 m × 0.25 mm id, 1 μm film
Column temp.	70°C → ^{2min} 70°C → ^{20°C/min} 230°C → ^{5min} 230°C
Injection temp.	250°C
MS	HP 5972
Ionization method	EI
Ion source temp.	280 °C
Ionizing voltage	70 eV
Emission current	300 μA
Quantitation	selected-ion monitoring, m/z 91

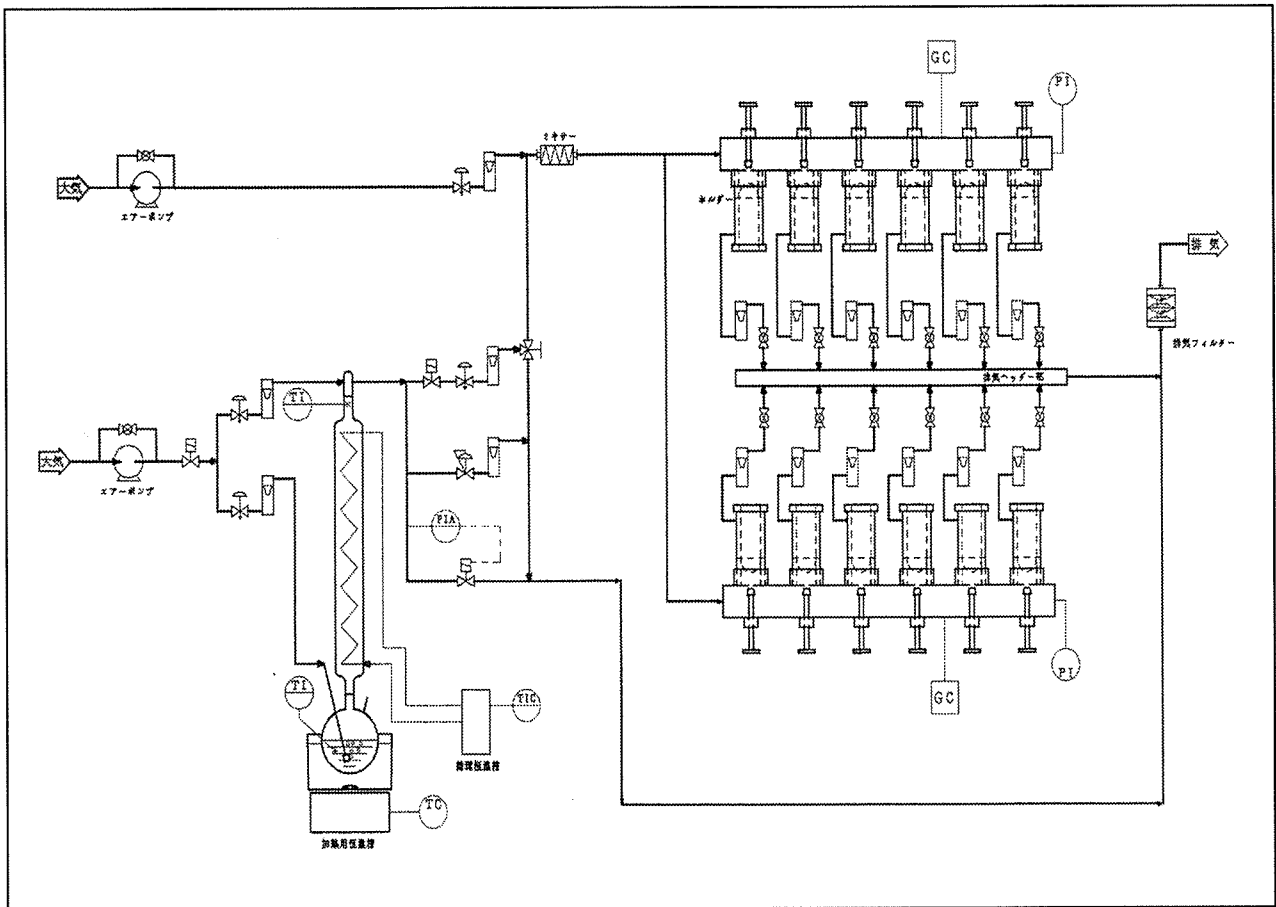


Figure 1. 吸入曝露装置

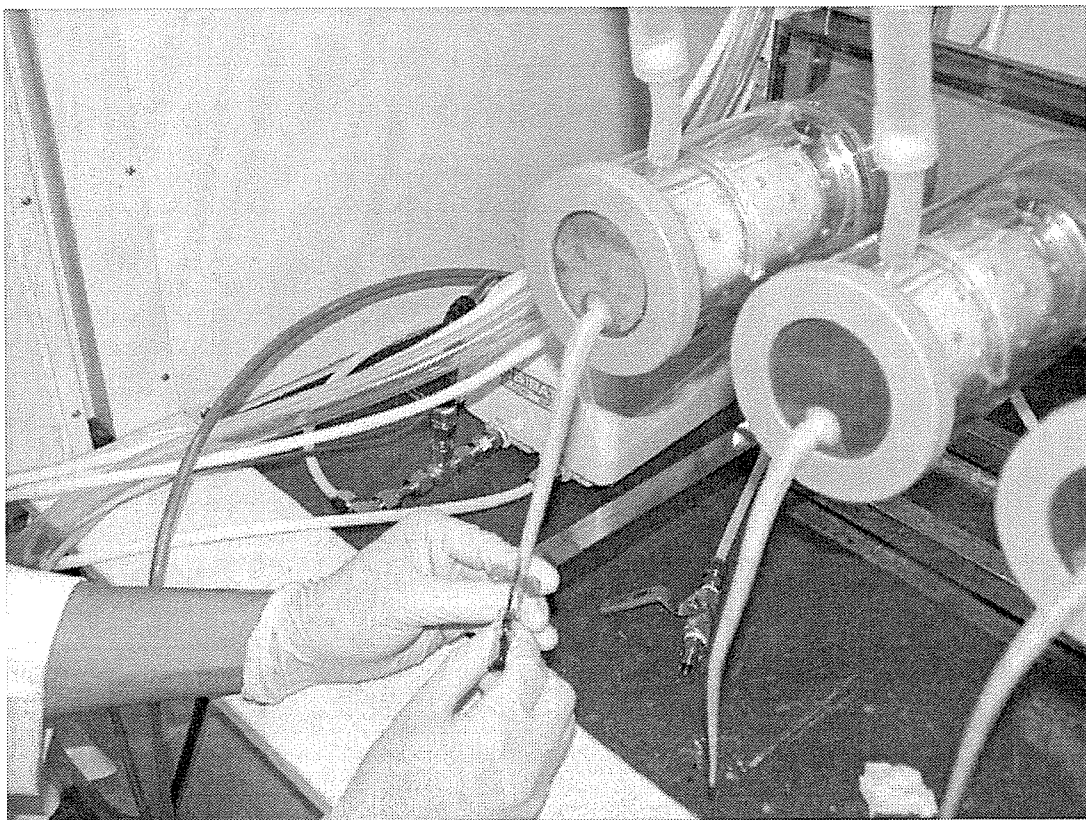


Figure 2. 吸入曝露中のラットからの採血



Figure 3. 化学物質の呼気からの排泄量を測定する装置

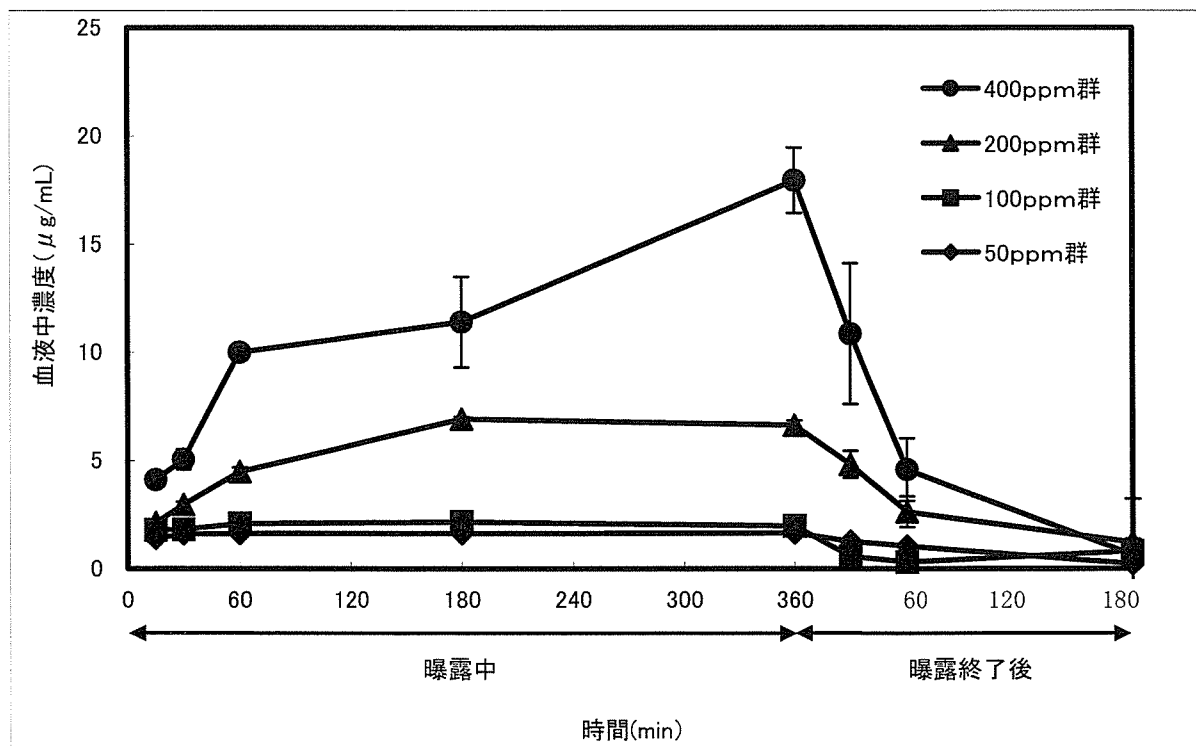


Figure 4. クロロホルムを吸入曝露したラットの血液中クロロホルム濃度の推移

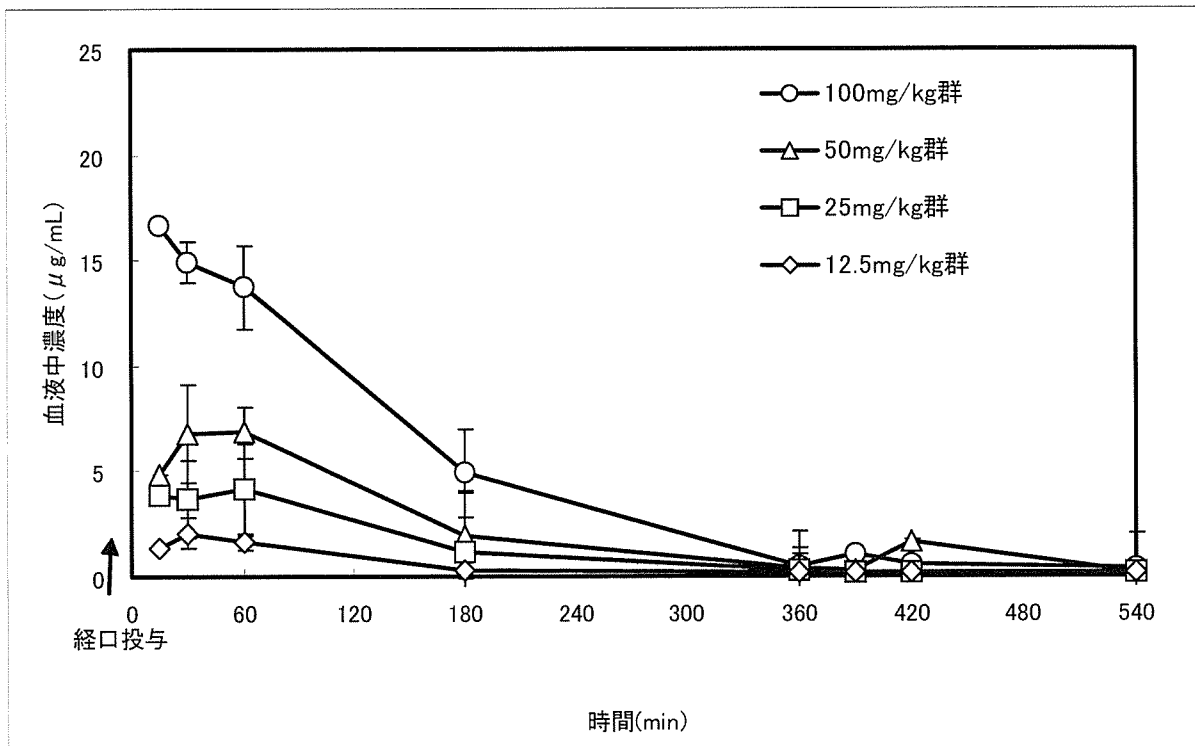


Figure 5. クロロホルムを経口投与したラットの血液中クロロホルム濃度の推移

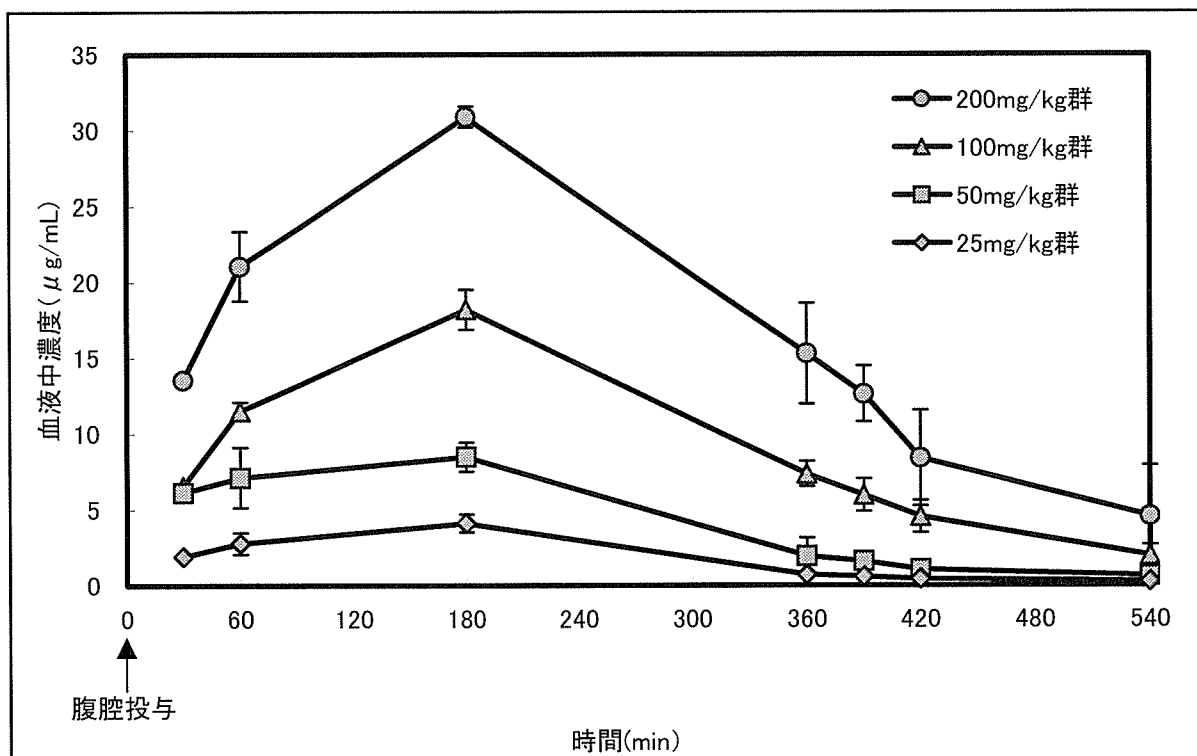


Figure 6. トルエンを腹腔内投与したラットの血液中トルエン濃度の推移

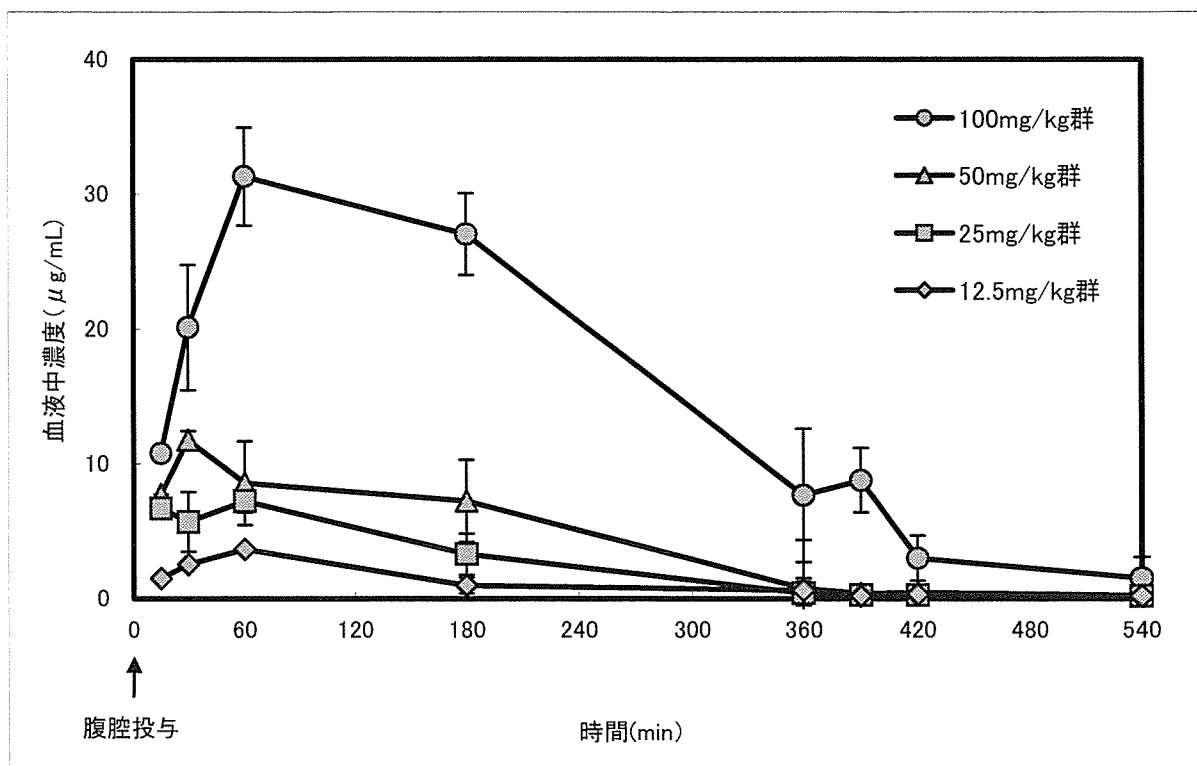


Figure 7. クロロホルムを腹腔内投与したラットの血液中クロロホルム濃度の推移

Ⅲ－１．２．低濃度アセトアルデヒド経気道暴露による生体影響評価

分担研究者 嵐谷 奎一 産業医科大学 産業保健学部 教授
研究協力者 樺田 尚樹 産業医科大学 産業保健学部 助教授
吉田 安宏 産業医科大学 医学部 講師
笛田由紀子 産業医科大学 産業保健学部 助手

研究要旨：化学物質過敏症の原因物質のひとつとして懸念されているホルムアルデヒド同様にアルデヒド類の一種で人体への曝露も比較的大きいと予想されるアセトアルデヒドの実験動物を用いての生体影響について検討した。マウスに25ppmおよび125ppm濃度で連続4週間の曝露実験を実施した。その結果、病理学的に明白な変化は観察されなかった。またアセトアルデヒド-ヘモグロビン付加体や変異原性試験においても陽性結果は認めなかった。一方、免疫学的パラメータにおいては、特にTリンパ球系の増殖刺激を受けている可能性が示唆された。

A. 研究目的

毎年約 4100 種がケミカルアブストラクトに新規に登録されているように、近年我々の生活環境中の化学物質の種類増加は著しい。さらにオフィスや住宅の建材の変化・気密性の増加なども加わり、種々の症状を訴える人が増加し、シックビルディング症候群あるいは化学物質過敏症（以下 MCS）という概念が提唱され、その対応が緊急に迫られている。一方で MCS に関しては概念・病態は解明されておらず、定義もいくつもあるなどコンセンサスが得られていない部分が多く問題が残されている。

われわれは、これまでに環境省の「本態性多種化学物質過敏状態の調査研究」の一環で「モデル動物を利用した非アレルギー性の過敏状態の発症機序の検討」を分担実施し、その中で MCS の原因物質として最も懸念さ

れているホルムアルデヒドについてマウスを用いた低濃度経気道曝露実験を実施して来た。その結果、低濃度においても中枢神経系に対する刺激、視床下部-下垂体軸に対するストレス反応やそれらに基づくと思われる不安行動の誘発などが観察された。

ホルムアルデヒドの発生源、MCS への関与などの指摘より代替物質としてのアセトアルデヒドの接着剤、防腐剤、フィルム現像液などの使用が増加傾向にある。アセトアルデヒドはラットの経気道曝露による鼻腔嗅覚上皮への影響を考慮して室内濃度指針値 30ppb が設定されていたが最近 WHO が新しく 180ppb の基準値を示し、厚生労働省でも指針値の再検討を迫られている。このような状況下で本研究ではアセトアルデヒドについて低濃度経気道曝露実験系を確立し、その生態影響を評価することを実施した。

B. 研究方法

(1) 吸入曝露装置

吸入曝露実験装置の概略図(図1)を示す。装置はアセトアルデヒドのガス発生装置と、曝露チャンバーとから構成されている。

アセトアルデヒドガスの発生には、ディフュージョンチューブ法(ガス拡散管法)を用いた動的ガス発生法によった(図1)。ガス拡散速度は拡散管の断面積に比例し、長さに反比例する。ガス拡散管(ディフュージョンチューブ)(3)を低温恒温槽(2)に設置し、一定流量の空気を送気して一定濃度のガスの発生を得た。

本研究ではアセトアルデヒド濃度は0、25、125ppmの三段階濃度とした。設定濃度は基本的に恒温槽温度、吸気量及びガス拡散管の形態によった。

曝露チャンバー(容積100L)(4)はステンレス製で、下部に尿・糞を廃棄処理するための容器(5,6)が取り付けられている。また、チャンバー側面には、内部の空気をサンプリングするためのガス採取口が取り付けられている。このチャンバーの下部よりポンプ(7)を用いて空気を排気することにより、チャンバー上部から室内空気を希釈空気として導入した。アセトアルデヒドガスを含む空気は、チャンバー上部のT字型の配管部の側面から導入され、希釈空気と混合してチャンバー内に入れた。

(2) 実験動物、曝露濃度

実験に用いた動物はC57BL/6N雄性マウス、10週齢である。曝露条件は、2~3日に一度動物および曝露装置の維持管理のために数時間の中断を置く以外は一日24時間、4週間の連続曝露とし、濃度は0ppm、25ppm、

125ppmの3段階で行った。

(3) 曝露濃度評価

チャンバー内曝露濃度は、検知管法および化学分析により評価した。すなわち2,4-dinitrophenylhydrazine(DNPH)を含まれたシリカゲルカラム(Waters Sep-Pak XPOsure™ Aldehyde Sampler)に気中アセトアルデヒドを捕集し、アセトニトリルで溶出後、逆相型カラムを用いる高速液体クロマトグラフィーにて分離・定量を行った(図2、3)。また、曝露中の濃度変化を、ホルムアルデメーター(JMS,東京)を用いて連続モニタリングを実施した。ホルムアルデメーターは、本来ホルムアルデヒドを測定する装置であるが、アセトアルデヒドにも交叉反応を示し、今回の実験では、チャンバー内化学物質としてはアセトアルデヒドだけが占める状態にあるため、相対的な濃度の評価は可能であった。

(4) バイオロジカルモニタリング

生体内曝露指標としてアセトアルデヒドへヘモグロビン付加体を測定することを試みた。

すなわちヘパリン加採血し、遠心分離をすることによって血漿と赤血球層を分離し、赤血球を生理食塩水で三回洗浄後、蒸留水を加え溶血し、さらに四塩化炭素を加えて高速遠心分離し debris の除去を行い、上層をエッペンドルフチューブに分注した(=A液)。

Cyclohexan-1,3-dioneを含む反応試薬と上記のA液あるいはその希釈液と反応させ誘導体を形成し、HPLCで分離・定量した(図4)。

アルデヒド類とCyclohexan-1,3-dioneとの誘導体測定はHITACHI L-7485の装

置で、カラム Wakosil-(II)5C18 (250mm × 4.0mm, I.D.)、移動相は水/アセトニトリル=60/40 (v/v)、検出は励起波長が 370nm、測定蛍光波長は 450 nm で行った。同時にヘモグロビン濃度をシアンメトヘモグロビン法 (和光純薬、ヘモグロビン-テストワコー) を用いて測定した。

(5) 変異原性試験

脾臓 T リンパ球を採取し、*T cell receptor (TCR)* 遺伝子の突然変異頻度を解析した。マウスにおける本検出法はわれわれが開発した手法 (Kunugita, N. et. al. J Occup Health 38: 25-29, 1996.) で、成熟 T リンパ球は細胞表面に CD3 抗原を有しており、この分子は TCR の α , β 鎖または γ , δ 鎖遺伝子産物と複合体を形成しないと細胞膜表面に発現されないため *TCR* 遺伝子に突然変異を来たした場合 TCR/CD3 複合体が正常に細胞膜に発現されず CD3⁻ 変異 T 細胞が出現する。この性質を利用してフローサイトメーター (FACS) を用い、FITC ラベル抗 CD3 抗体と PE ラベル抗 CD4 抗体を用いて T リンパ球を 2 重染色することにより、*TCR* 遺伝子に突然変異を来たした結果、CD3⁻ 4⁺ という異常な表現型をもつ T リンパ球が検出される。その頻度を算出して *TCR* 遺伝子突然変異頻度とした。

(6) 免疫学的検索

①脾細胞数、細胞分画の比較

曝露終了後、各マウスより脾細胞単細胞浮遊液を作成し、細胞数のカウントとともに、各種蛍光色素をラベルした、抗 CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD44 モノクローナル抗体で染色後、FACS を用いて細胞分画の比較を行った。

②細胞増殖試験

上記脾細胞浮遊液を、リンパ球マイトジェン LPS, ConA で刺激培養し 56 時間後に ³H-チミジンを添加培養を行い、16 時間後に細胞をハーベストして ³H-チミジン取り込み量より細胞増殖を観察した。

③サイトカイン類の測定

脾細胞を LPS 刺激下に 24 時間培養し、その培養上清中の IL-6 濃度を ELISA 法にて測定した。そのほかに、曝露終了後各マウスより肺胞洗液 (BALF) を採取し、その中の Th1/Th2 バランスに関与するサイトカイン類 (IL-2, IL-4, IL-5, TNF, IFN- γ) の濃度を、Mouse Th1/Th2 Cytokine CBA kit (日本ベクトン・ディッキンソン) を使用し FACS にて解析した。

(7) 病理学的検索

曝露終了後、マウスをネンブタール深麻酔下に失血死させてから断頭し、気管・肺、食道、肝臓を採取して、4%パラホルムアルデヒド/0.1M 燐酸緩衝液 (pH7.4) にて浸漬固定した。頭部は、皮膚、下顎、脳を取り除き同固定液で浸漬固定した後、EDTA 脱灰液 (和光純薬) にて脱灰して 4 つの部位に切り出した。すべての臓器は、型どおりのパラフィン包埋と薄切をおこない、HE 染色標本を作製した。

C. 研究結果

1. 曝露濃度および体重変化

曝露は、それぞれの濃度で各 2 回ずつ実験を実施した。

一連の曝露時間中のある 2 日間のチャンバー内の濃度変化を連続測定した結果を図 5 (25ppm)、図 6 (125ppm) に示す。25ppm 曝露では目的濃度に対して $\pm 20\%$ の範囲で安定して濃度を維持できた (図 5)。125ppm の場合は、曝露開始時に濃度上昇に伴い 1~2 時間設定

濃度より高い 300ppm 程度になる時間があるが、その後は設定濃度に復し、安定した曝露が行えた(図 6)。

各群の体重を週に 2 回計測観察した結果、図 7 に示すように 125ppm 群では若干体重増加の抑制が認められたが、曝露終了時の体重は、分散分析・多重比較の結果、コントロール群と有意な差異は認めなかった(図 8)。

2. バイオロジカルモニタリング

マウス血液を用いて、生体内曝露指標としてのアセトアルデヒド-ヘモグロビン付加体の測定を行った。クロマトグラムの 1 例を図 9 に示す。このクロマトグラムにより明確なピークを分離定量することが可能であり、陽性コントロールとしてアセトアルデヒドを経口投与したマウスの血液サンプルではコントロールに比べ明らかにピークの増大が認められた。図 10 にコントロール、25ppm、125ppm 曝露群、およびアセトアルデヒド経口投与群のマウスより採血し、アセトアルデヒド-Hb 付加体を定量した結果の比較を示す。コントロール、25ppm、125ppm とともにヘモグロビン付加体量はほぼ同じ濃度レベル ($6 \mu\text{mol/gHb}$) で差が認められなかった。また、比較として、マウスに直接経口的にアセトアルデヒド (100mg/kg) を注入し、20 時間後に採血し、アセトアルデヒドヘモグロビン付加体を測定した。その結果、血中のアセトアルデヒド濃度がコントロールに比べ有意 ($p < 0.05$) 上昇することが認められた。アセトアルデヒドは、赤血球により取り込まれ、ヒトおよびヒビのエタノール摂取後には、*in vivo*(生体内)において、その細胞内濃度は血漿の 10 倍にもなり得ることが報告されている。経気道曝露においても生体内曝露指標として有用と考えられる。

3. 変異原性試験

図 11 に TCR 遺伝子座突然変異頻度の比較をします。25ppm、125ppm 曝露群いずれもコントロールに比べ有意な突然変異の増加を認めなかった。

4. 免疫学的パラメーター

①脾細胞数・細胞分画

各群マウスの個体あたりの脾細胞数は、図 12 に示すように相違は認めなかった。

脾細胞中の細胞分画を FACS にて解析した結果を図 13~20 に示す。免疫担当細胞のうち CD3 陽性の T リンパ球は 125ppm 曝露群で若干ながら有意に増加を認めた(図 13)。一方、B リンパ球は逆に曝露により減少した(図 14)。T リンパ球分画の中では、CD4 および CD8 陽性 T リンパ球いずれにおいても CD44⁺、CD25⁻ naïve T リンパ球が曝露により増加していた(図 15, 16)。一方、CD44⁺、CD25⁺ activated T リンパ球は CD4 陽性 T リンパ球では曝露により減少(図 17)が認められたが、CD8 陽性 T リンパ球では変化無かった(図 18)。また CD44⁺、CD25⁻ memory T リンパ球は、125ppm 曝露群で CD4 および CD8 陽性 T リンパ球いずれにおいても有意な減少が認められた(図 19, 20)。

②細胞増殖

図 21 に、マイトジェン刺激したときの細胞増殖を Stimulation index で比較し、示した。LPS 刺激では、アセトアルデヒド曝露群もコントロールも差異は認めなかったが、Con A 刺激に際しては、アセトアルデヒドの曝露濃度依存的に細胞増殖の増大が観察された。

③サイトカイン類の測定

脾細胞を LPS 刺激した培養上清中の IL-6 濃度(図 22)、あるいは各群マウスの肺

胞洗浄液中の各サイトカイン濃度(Data not shown)は、特に相違を認めなかった。

5. 病理学的検索

頭部鼻腔組織に関して、一般に鼻腔上方は一部を嗅上皮、下方を扁平上皮、呼吸上皮で覆われている。125ppm 曝露群においてもこれら組織において上皮のびらん、出血、変性像などの明らかな変化は認められなかった(写真1)。また、上気道・肺に関して、明らかな上皮の剥離、炎症細胞の浸潤等は認められなかった(写真2)。

D. 考察

アセトアルデヒドの人への健康影響としては、飲酒時のいわゆる二日酔いの原因物質の一つとして知られる。また蒸気は目、鼻、のどに刺激がある。目に侵入すると結膜炎や目のかすみを起こす。長期間の直接接触により発赤、皮膚炎を起こすことがある。高濃度蒸気の吸入による中毒症状として、麻酔作用、意識混濁、気管支炎、肺浮腫等があり、初期症状は慢性アルコール中毒に似ている。

比較的高濃度曝露時のこれらの影響はこれまでも報告されてきた。しかし、シックビルディング症候群あるいはMCSという概念を想定しての曝露実験はあまり実施されていない。そこで、本研究は比較的低い曝露濃度による経気道曝露実験系を確立しマウス経気道曝露実験を実施した。

曝露系は、昨年度、10ppm 前後の低濃度アセトアルデヒドの吸入曝露実験系を確立した。昨年度の方法を改良して本年度は 25ppm、125ppm の濃度にてマウス経気道曝露を実施し、変異原性試験、免疫学的パラメーターの変化、病理学的変化の有無などについて包括的に観察し、生体影響を検討した。

その結果、この程度の曝露濃度・曝露期間で

は、病理学的に明らかな悪影響を思わせる変化は認めなかった。また赤血球中のアセトアルデヒド-ヘモグロビン付加体濃度は、25ppm、125ppm、どちらの曝露も増加が観察されなかった。さらに125ppm 曝露を行っても、TCR 遺伝子座突然変異の検出系では突然変異の増加は観察されなかった。このことに関連してアセトアルデヒドは *in vitro* の実験系では種々の変異原性試験において陽性結果も得られ、さらに *in vivo* における小核試験などでも陽性所見が報告されている。国際がん研究機関 (IARC) の分類では2B (人に対して発がん性があるかもしれない) に分類されている。しかし、今回実験したような比較的低濃度曝露では、生体内代謝が早いので、ヘモグロビン付加体や変異原性が観察可能なほど血中濃度が高値を維持しないことが示唆された。

一方、免疫学的パラメータに関しては、若干ながら細胞分画の変化やマイトジェン刺激に伴う細胞増殖の増強などの変化が観察された。特にTリンパ球系のマイトジェンであるConA 刺激に関しては、2回の曝露実験で明らかな増殖能の増加が認められた。各種サイトカインに関しては変化は認められなかったが、この程度の低濃度アセトアルデヒドの経気道曝露で免疫系のパラメータが変化することは興味深いことであり、今後さらに検討が必要とおもわれる。

E. 結論

アセトアルデヒドの曝露実験系をガス拡散管法を用いて確立し、マウスに25ppmおよび125ppm濃度で連続4週間の曝露実験を実施した。その結果、病理学的に明白な変化は観察されなかった。またアセトアルデヒド-ヘモグロビン付加体や変異原性試験においても陽性結果は認めなかった。一方、免疫学的パラメータにおいては、特にTリンパ球系の増殖刺

激を受けている可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

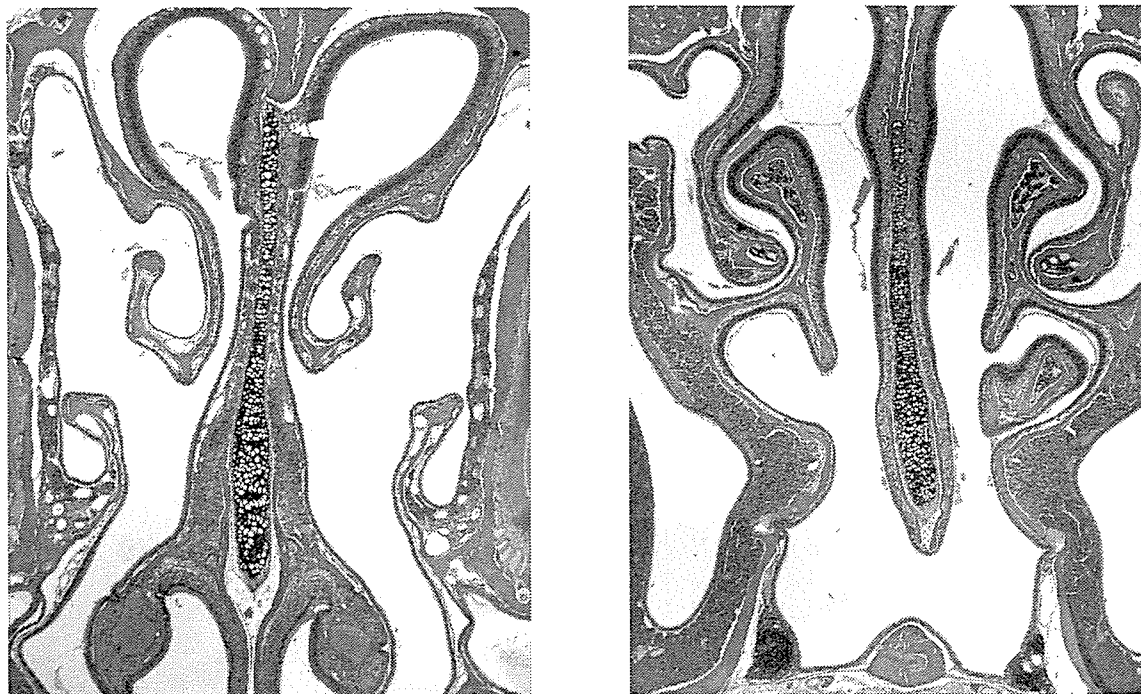


写真1 頭部鼻腔組織(125ppm 群)：鼻腔上方の一部を嗅上皮、下方を扁平上皮、呼吸上皮で覆われている。上皮のびらん、出血、変性像などの明らかな変化は無し。

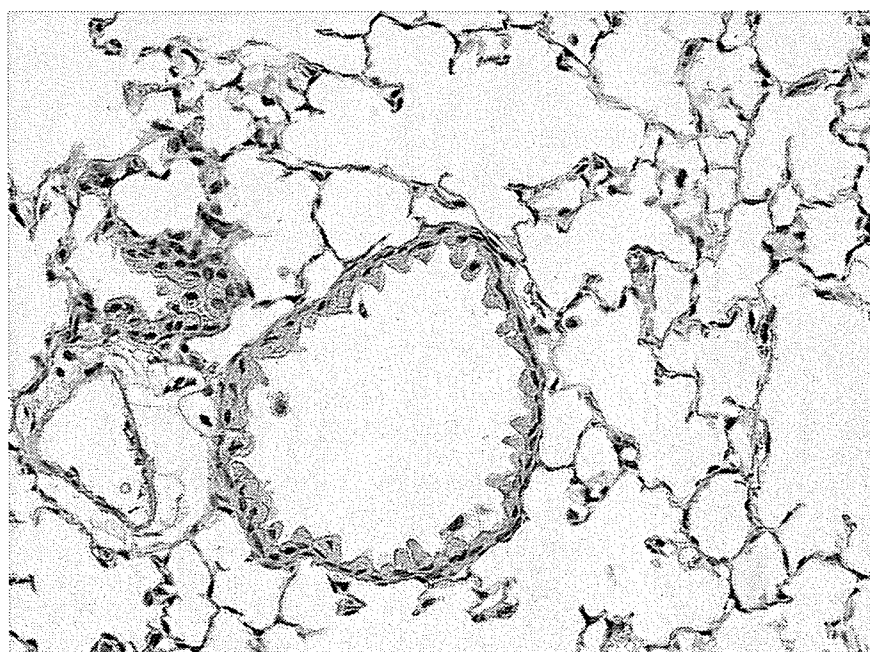


写真2 肺(125ppm 群)：明らかな上皮の剥離、炎症細胞の浸潤等は認められない。